

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580366
 研究課題名 (和文) 乳牛の消化管における vitamin D receptor 遺伝子の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of vitamin D receptor gene in the intestine of cattle
 研究代表者
 山岸 則夫 (YAMAGISHI NORIO)
 岩手大学・農学部・教授
 研究者番号：30281877

研究成果の概要：

乳牛の代表的疾病として分娩後低カルシウム (Ca) 血症がある。本研究課題では、その病態解明と予防法確立のための基礎研究として、vitamin D receptor (VDR) 遺伝子に関する解析を行った。その結果、牛の VDR mRNA の塩基配列が明らかになった。また、VDR 遺伝子の一塩基多型が示唆され、消化管粘膜 VDR mRNA 発現量への影響要因も示された。今後、他の因子に関する解析も行うことで低 Ca 血症の病態を明らかにし、予防法開発の一助とすべきである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード： 遺伝子、乳牛、VDR

1. 研究開始当初の背景

乳牛では分娩後に血中カルシウム (Ca) 濃度は低下 (低 Ca 血症) し易い。この低下が著しい場合 (3～6 mg/dl) に乳熱 (産褥麻痺) という起立不能症候群を発症するが、これは他の動物種にない特有のものである。また、乳熱に至らなくとも、軽度の潜在性低 Ca 血症 (7～8 mg/dl) は各周産期疾患 (産褥期子宮疾患、ケトーシス、第四胃変位) を誘発する。

一般に、低 Ca 血症の発生要因は、分娩に伴う急激な乳中への Ca 流出とそれに伴う体内 Ca 貯蔵量の不足である。これに対し生体は骨や消化管から Ca を動員し恒常性を保とうと

するが、分娩直後の乳牛では骨での Ca 吸収は抑制され、消化管での吸収に依存している。国内外において乳牛の低 Ca 血症に関する研究は多いが、未だ明確な病態解明には至っておらず、それ故、確実な予防法も確立されていない。その理由として、反芻動物である乳牛における Ca 代謝機構、とくに消化管での Ca 吸収機構の理解のために、単胃動物の研究成果を引用する機会が多いことも関係すると考えられる。

Ca 欠乏時における消化管の Ca 吸収には粘膜細胞での能動輸送が深く関わっており、近年、その制御因子である各種 Ca 輸送関連タンパク質が単胃動物で同定され注目を浴びてき

た。最近、我々は乳牛の消化管における Ca 輸送関連タンパク質に関する解析を行い、細胞質内での Ca のシャトル輸送を担当する calbindin D_{9k} (CaBP_{9k}) mRNA は十二指腸でのみ組織特異的に発現し、小腸全域と大腸の一部で発現している単胃動物より限局することを明らかにした。さらに、我々は CaBP9k と細胞基底膜で Ca ポンプとして働く plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) の mRNA 発現量は血中 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) 濃度と正の相関を有すること、1,25(OH)₂D₃ の投与によってその発現量が増加することを明らかにしてきた。したがって、乳牛の消化管における Ca 能動輸送機能の分布様式は牛特有のものであり、単胃動物の場合と同様にその発現は vitamin D の生理活性型である 1,25(OH)₂D₃ に制御されると考えられた。

分娩直前乳牛への 1,25(OH)₂D₃ の投与によって分娩後の血中 Ca 濃度の低下は軽減するが、その効果の多くは消化管の Ca 吸収の増加に起因すると考えられる。1,25(OH)₂D₃ の Ca 輸送関連タンパク質発現への影響は vitamin D receptor (VDR) を介する。現時点において、乳牛の VDR gene の塩基配列は明らかになっているが、mRNA の塩基配列情報は NCBI の WEB 上で automated computational analysis データが公開されているのみであり、実際の解析が待たれるところである。

2. 研究の目的

乳牛の低 Ca 血症の病態解明と予防法確立のための基礎研究の一環として、以下の解析を行う。

(1) 乳牛の血液および消化管における VDR gene および mRNA の塩基配列を解析による transcript variants ならびに一塩基多型 (SNPs) の調査

(2) 消化管粘膜の VDR mRNA 発現量への影響要因の解析

3. 研究の方法

(1) VDR 遺伝子ならびに mRNA の塩基配列の解析

①VDR mRNA 塩基配列解析

子牛 12 頭の消化管粘膜より total RNA を抽出後、NCBI の牛 VDR mRNA 予測配列 (GenBank

Acc No. XM_613129) の ORF 領域を包括する 3 種のプライマーセット (図 1) を使用し PCR を行った。塩基配列の解析は、RT-PCR 産物のダイレクト・シーケンスによって行った。

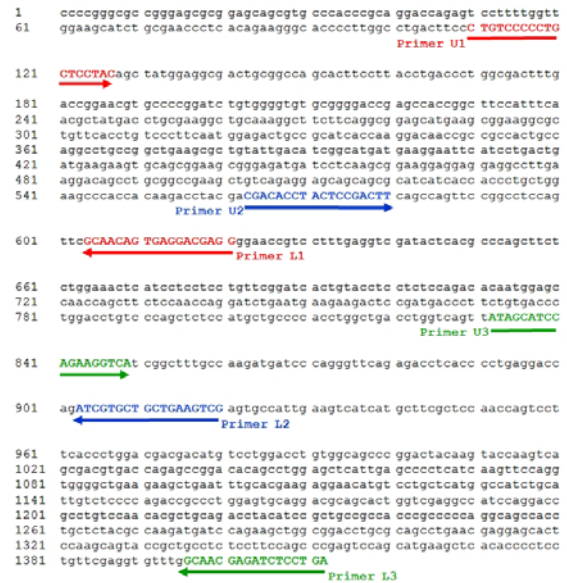


図1. 牛のVDR mRNAの予測配列 [Acc No. XM_613129. PREDICTED: Bos taurus vitamin D receptor, transcript variant 1 (VDR), mRNA] と3種のプライマー位置

②VDR gene の SNPs 解析

牛 207 頭 (ジャージ種 40 頭、黒毛和種 112 頭、55 頭) の血液および精液から DNA を抽出し、NCBI 上で公開されている 2 種の SNPs (図 2) について解析した。すなわち、Ref SNP ID: rs43433069 (Exon 2) については PCR-PIRA 法 (図 3) にて、Ref SNP ID: rs43433070 (Intron 2) については PCR-RFLP 法 (図 4) にて解析した。

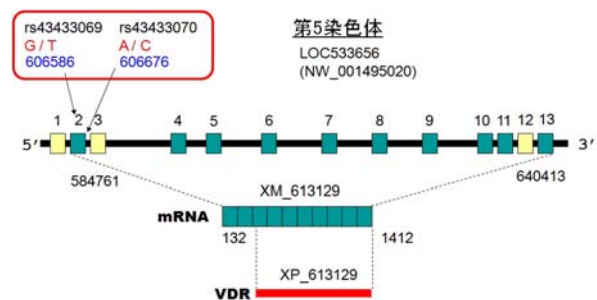


図2. NCBIにおける牛VDR遺伝子のSNPsの位置 [Ref SNP ID rs43433069 およびrs43433070]

